

A teafa illóolaj biofilm-képződést gátló hatása kórházi környezetben előforduló baktériumok ellen

ORMAI EDIT, KOCSIS BÉLA, BÖSZÖRMÉNYI ANDREA, HORVÁTH GYÖRGYI,
BALÁZS VIKTÓRIA LILLA

Nozokomiális fertőzések

Nozokomiális infekciónak nevezünk minden olyan, kórházi ellátással összefüggő megbetegedést, amely az intézményi felvételt követő 48 órán túl jelenik meg.¹ Jelentős problémát okoznak az egészségügyi szakemberek mindennapi munkájában, mert amennyiben megjelenik egy adott osztályon a kórokozó, nehéz ellene hatékonyan fellépni.

Általánosságban elmondható, hogy ezen patogének főképpen baktériumok.² Megnehezíti a fennálló állapotot az is, hogy az antibiotikumok széles körben való használatának köszönhetően egyre több baktérium rezisztenciát fejlesztett ki a túlélés érdekében. Fontos megemlíteni, hogy előfordulásuk szorosan kötődik egyszerűhasználatos, invazív eszközök felhasználéséhez (katéterek, vénabiztosítás eszközei), mert ezek kaput nyitnak a szervezetben történő kolonizáláshoz.

A fenti tényezők mellett a hospitalizációs idő (mennyi időt tölt a páciens az intézményben) is jelentős szerepet játszhat a fertőzések terjedésében. Minél inkább megnyúlik az ápolás ideje, annál nagyobb a valószínűsége a fertőződésnek és annak terjedésének.

A hazai adatok alapján, a Nemzeti Népegészségügyi Központ felmérése szerint, 2021-ben 7166 esetet regisztráltak. A leggyakoribb fertőzés a húgyúti infekció volt, ezt követte a véráramfertőzés és a légúti fertőzések.³

Biofilmek

A biofilmek változatos, élettelen felületeket is kolonizáló, baktériumok által képzett összefüggő baktériumközösségek. Jellemző rájuk az önszerveződés, a fokozott stabilitás és az ellenállóképesség a külső behatásokkal szemben, legyen az fizikai vagy kémiai.⁴

1 A. SIKORA – F. ZAHRA (2023) *Nosocomial Infections*

2 P. AGABA – J. TUMUKUNDE – J. V. B. TINDIMWEBWA, – A. KWIZERA (2017) *Nosocomial bacterial infections and their antimicrobial susceptibility patterns among patients in Ugandan intensive care units: a cross sectional study*

3 https://www.nnk.gov.hu/dokumentumok/NNSR_jelentés_2021._1._rész_Kötelező_surveillance_modulok.pdf (Letöltés: 2024.02.21)

4 RODNEY M. DONLAN (2002) *Biofilms: Microbial Life on Surfaces*

Stabilitásuk több pilléren nyugszik. Létrehoznak egy stabil extracelluláris mátrixot, amely barrierként képes védeni őket. Emellett magasfokú rezisztenciával rendelkeznek antimikrobás szerekkel szemben. Ezt úgy érik el, hogy különböző mechanizmusok segítségével átadják egymásnak az eltérő szerek ellen kifejlesztett rezisztenciagénjeiket.

A biofilm-képzés tulajdonsága valószínűleg hatalmas szelekciós előnnyel ruházta fel ezen ágenseket, mert sokkal ellenállóbbá, védettebbé tette az eredendően fragilis és önmagában életképtelen mikroorganizmusokat.⁴

Kialakulásuk folyamatát öt lépésben tudjuk meghatározni. Első lépésben a baktériumok különböző függelékeik alkalmazásával (fimbria, flagella, pili) reverzibilisen kapcsolódnak a felülethez.

A kötődés után elkezdik termelni az extracelluláris mátrixot, amely már megalapozza a második lépést, amikor a következő réteg baktérium csatlakozhat a közösséghez. Ilyenkor már irreverzibilisen kötődnek a felülethez.

Ekkor elkezdődik a korlátlan szaporodás, és fejlődés, amely a harmadik lépésnek tekinthető. Innentől fogva a kolónia önnfenntartó, és létrehozza a háromdimenziós jellegzetes szerkezetet, amely már a negyedik lépést jelenti. Az ötödik lépés a terjedés. Ilyenkor a már érett biofilmből kisebb egységek válhatnak ki, és képesek további felületeket uralni.

Illóolajok

Az illóolajok szobahőmérsékleten maradéktalanul elpárolgó, jellegzetes ízű és illatú, hidrofób tulajdonságú, több komponensből álló folyadékok. Vízgőz-desztilláció segítségével nyerhetők ki különböző növényi részekből (levél, bimbó, virág, kéreg, gyümölcs, magvak). Az illóolajok a növényen belül jellegzetes szövettani képletekben halmozódhatnak fel, mint például mirigyszőrök vagy illóolaj-járatok. Valószínűsíthető, hogy a növények maguk is ellenállóképességük fokozására termelik ezen olajokat.⁵

Összetételük széles palettán mozoghat. Komplex kémiai vegyületek, számos major és minor komponensből állnak. Monoterpének, szekviterpének, fenil-propán-származékok és ritkábban diterpének elegyei lehetnek. Fontos jellemzőjük, hogy major komponenseik főképpen hidrofób tulajdonságúak, így ezen tulajdonságuk alkalmassá teszi őket a lipidgazdag bakteriális membrán megtámadására és a baktériumok degradálására.

Teafa illóolaj bemutatása

A teafa illóolaja a mirtuszfélék családjába tartozó, Észak-Ausztráliából származó ausztrál teafa cserjéből származik. A teafa növény (*Melaleuca alternifolia* [Maiden and Betche] Cheel) akár 6 méter magasra is képes meg-

5 <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/essential-oils>

nőni. Levelei keskenyek, csupaszak, és változó állásúak a száron, az illóolaj ebből származik.⁶

Gyógyászati célokra már évezredek óta használják. Az ausztrál őslakosok a cserje leveleiből gyógyító teát készítettek. Összetörték a növény leveleit, majd ezután inhalálták a frissen tört teafalevelek illóolaját meghűlés gyógyítására. Külsőleg is alkalmazták sebek fertőtlenítésére. A II. világháború idején minden katonai elsősegélydobozban megtalálható volt, kiváló fertőtlenítő hatása miatt.⁶

Az irodalmi adatok alapján bizonyítottan antibakteriális és antifungális hatású.⁷

Baktériumok bemutatása

A baktériumok kiválasztása alapos körültekintéssel történt. Célunk volt olyan patogéneket bevonni a kísérletbe, amelyek a mindennapi, klinikai környezetben gyakorlati problémát jelentenek, így az intenzív terápiás osztályokon négy, leggyakrabban azonosításra kerülő baktérium került vizsgálatra.

Escherichia coli

Az *Escherichia* nemzetségbe tartozó, Gram-negatív, pálcika alakú, 2 µm hosszú és 0,5 µm átmérőjű kórokozó. Aerob, fakultatív anaerob baktérium, amely szinte minden emberi és állati bélflórában fiziológiásan megtalálható. Emellett patológiás folyamatokban is gyakran részt vesz, a kórképek lokalizációja alapján a törzsek feloszthatók patogenitási csoportokba. Beszélhetünk extraintesztinális, vagy intesztinális, hasmenést okozó törzsekről is. A kórokozók gyakran kolonizálják az urogenitális régiót is. A változatos tünetek hátterében az eltérő mennyiségű, minőségű és kombinációjú virulenciafaktorok tehetők felelőssé.⁸

Klebsiella pneumoniae

A *Klebsiella* nemzetségbe tartozó, Gram-negatív, pálcika alakú, tokkal rendelkező, fakultatív anaerob baktérium. Nevéhez híven főképp súlyos, gyakran felső lebenyeket érintő, tályogos, lobaris tüdőgyulladást okoz. Előfordulhat húgyúti infekciókban is, azonban legjelentősebb a kórházakban,

6 <https://www.nccih.nih.gov/health/tea-tree-oil>

7 M. WRÓBLEWSKA – E. SZYMAŃSKA – K. WINNICKA (2022) *The Influence of Tea Tree Oil on Antifungal Activity and Pharmaceutical Characteristics of Pluronic® F-127 Gel Formulations with Ketoconazole*

8 PÁL E. *Az orvosi mikrobiológia tankönyve*, Budapest : Medicina könyvkiadó, 2013., 284–286.

legyengült immunogenitású betegekben okozott, nozokomiális fertőzésekben tulajdonított szerepe.

Hatékony virulenciafaktora a tokja, amely miatt hatékonyan ellenáll a fagocitózisnak. Krónikus húgyúti infekció esetén a kórokozó jelenléte kőképződésre is hajlamosít, mert ureáz enzimének köszönhetően lúgos közeget teremt, amely kedvező környezetet biztosít különböző húgykövek kialakulásához.⁹

Streptococcus pneumoniae

A *Streptococcus* nemzetségbe tartozó, Gram-pozitív coccus, amely tokos, megnyúlt diplococcusként jelenik meg.

Szerepe kimagaslóan fontos pneumoniákban, a lobaris pneumoniák leggyakoribb okozója. Gyakori kórokozója továbbá egyéb nyálkahártya-fertőzéseknek, mint a szinusztisz, otitisz media, szepszis, meningitisz.

Sokféle virulenciafaktoralal rendelkezhet. Például kolinkötő fehérje, neuramidáz, IgA1 proteáz, amely többek között lehetővé teszi a baktérium nyálkahártyához való kötődését.¹⁰

Staphylococcus aureus

A *Staphylococcus* nemzetségbe tartozó, Gram-pozitív, 0,5-1,5 µm méretű coccus. Jellemzően a kültakaró és a felső légutak flóráját kolonizálja. Gyakran okoz lágyrészfertőzéseket ezen tulajdonsága miatt. Nevét a tenyészetekben fellelhető, aransárga pigmentnek köszönheti.

A *S. aureus* törzsek gyakran rendelkeznek különböző tokokkal, amelyek fagocitózis-ellenes hatásúak. Számos törzs termel a sejtfelnsínnel laza kapcsolatot teremtő polisacharidokat (PIA), amelyek az abiogén felnsínen (például: katéterek, lélegeztető tubusok, implantátumok) létrejövő biofilm-képzés jelentős faktoral.

Fontos kiemelni, hogy az elmúlt években a leggyakoribb rezisztencia-mechanizmusok fejeződnek ki a baktériumban. A meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*, vagy a vankomicin-rezisztens *Staphylococcus aureus* szintén óriási problémát jelentenek a klinikai gyakorlatban.¹¹

9 PÁL E. Az orvosi mikrobiológia tankönyve, Budapest : Medicina könyvkiadó, 2013., 327.

10 PÁL E. Az orvosi mikrobiológia tankönyve, Budapest : Medicina könyvkiadó, 2013., 264–266.

11 PÁL E. Az orvosi mikrobiológia tankönyve, Budapest : Medicina könyvkiadó, 2013., 266–268.

Analitikai vizsgálatok

A kísérleteink során alkalmazott teafa-illóolaj kereskedelmi forgalomból származott (azonosító száma: S7281/2112).

Az illóolajok összetételére vonatkozó vizsgálatok kivitelezése a tömegspektrométerrel kapcsolt gázkromatográfia (GC-MS) módszere alkalmas. Ez az analitikai módszer meghatározza az illóolajok kvalitatív és kvantitatív összetételét.

Az analitikai vizsgálatokat a Semmelweis Egyetemmel kooperációban kiviteleztük. A direkt folyadékinjektálás során 1 μL etanolban oldott illóolajat (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) juttattunk a készülékbe. Az injektálás 250°C-on történt, split módban, 1:50 split aránnyal. Az analízist Agilent 6890N/5973N GC-MSD (Santa Clara, CA, USA) készülékkel, Supelco SLB-5MS kapillaris kolonnán (30 m $\times$ 250 μm $\times$ 0,25 μm , GC-MS) és J&W (Agilent) DB-5MS kapillaris kolonnán (25 m $\times$ 250 μm $\times$ 0,25 μm ; GC-FID) végeztük. A kolonna hőmérséklete egy 3 perces izoterm szakasz után 60-250 °C-ra emelkedett 8 °C/perc sebességgel, a végső hőmérsékletet 1 percig tartottuk. A vivőgáz nagy tisztaságú hélium, az áramlási sebesség 1,0 mL/perc (37 cm/s) volt constant flow módban.

Az analitikai vizsgálatok során a tömegspektrometriás detektálás quadrupole tömegszelektív detektorral (MSD) elektronionizációs módban (70 eV), teljes scan módban történt.

Az adatokat MSD ChemStation D.02.00.275 software (Agilent) segítségével értékeltük ki. A komponensek azonosítása során a retenciókat és tömegspektrumokat standardok és a NIST 2.0 könyvtár adataival hasonlítottuk össze, a százalékos értékelést területnormalizációval végeztük.

Mikrobiológiai vizsgálatok

MIC meghatározás

Egy kémiai vegyület adott baktériumtörzsszel szemben mutatott hatékonyságát az úgynevezett minimális inhibitoros koncentráció adja meg. Ez az érték a vizsgált anyag azon koncentrációja, amely az adott törzs növekedését 90%-ban gátolja. Ennek az értéknek a meghatározására többféle módszer létezik, jelen kísérletünk során mikrodilúciós módszert alkalmaztunk.¹²

12 E-B. KERÉKES – É. DEÁK – M. TAKÓ – R. TSERENNADMID – T. PETKOVITS – C. VÁGVÖLGY –, J. KRISCH (2013) *Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms.*

Az illóolajmintákat a következő protokoll szerint készítettük elő: a vi-
zes bázisú baktériumszuspenzióba történő oldáshoz Tween40 emulgenst
(1%) használtunk (Sigma-Aldrich Kft.). Az alkalmazás célja az olajos bá-
zisú illóolajok vízbázisú baktériumszuspenzióban való oldása, amelyet
vizsgálataink során 1%-ban alkalmaztunk. A kiindulási koncentráció (illó-
olajtól és baktériumtól függően) 3,5-5 mg/ml volt, ezt 4-5 alkalommal hígí-
tottuk az előző koncentráció felére, a legalacsonyabb vizsgált koncentráció
0,156 mg/ml volt. A megfelelő csíraszám (10^5 CFU/ml) beállítását köve-
tően mind a vizsgált illóolajból, mind pedig a baktériumszuspenzióból
100-100 μ l mennyiséget mértünk a mikroplate üregeibe. A vizsgálati anyag
tápoldatban oldva került hozzáadásra. A megfelelő hígítású illóolajminták
baktériumszuspenziókhoz adását követően, inkubálás után (24 óra, 37°C)
600 nm-en abszorbanciát mértünk (BMG Labtech, Bio-Tek Kft.).¹²

Az illóolajat nem tartalmazó sejtzuspenziós tápoldat szolgált pozi-
tív kontrollként, a sejtmentes tápoldat negatív kontrollként. További emul-
gens kontrollt is alkalmaztunk, amelyben az illóolajok emulzifikálására
használt Tween40 tartalmú tápoldat szolgált kontrollként.

Azt a koncentrációt tekintettük MIC értéknek, ahol a pozitív kontroll
abszorbanciájához képest $\pm 10\%$ -ra csökkent értékeket mértünk.

Biofilm-képződés gátlása

A biofilmképződés-gátlás vizsgálata során az előzetesen meghatározott
MIC értékek felével dolgoztunk.¹³

A biofilmek 96 cellás mikrotiter lemezeken kerültek kialakításra. A
plate celláiba 200 μ L baktériumszuspenziót mértünk, majd 37°C-on, 4
órán keresztül inkubáltuk őket a sejtek adhéziójának elősegítésére. Az in-
kubációs idő letelte után a le nem tapadt sejteket fiziológias sóoldat segít-
ségével távolítottuk el. Ezt követően a letapadt baktériumsejteket az illó-
olajok minimális gátló koncentrációjának felével kezeltük. A kezelés után
a mikrotiter plate-eket újra 37°C-on, 24 órán keresztül inkubáltuk.

A 24 óra leteltét követően következett a kezelés után megmaradt
biofilmek láthatóvá tétele kristályibolya-festés segítségével. Első lépésben a
biofilmeket fixáltuk metanollal (szobahőmérséklet, 15 min). Ezt követően
festési eljárást alkalmaztunk. A kristályibolya-festék tulajdonsága, hogy a
negatív töltésű partikulumokhoz kötődik, ennek segítségével pedig sikere-
sen meghatározható a kezelt felületen megmaradt biomassa mennyisége.
Ezen fázis során 0,1%-os kristályibolya oldatot alkalmaztunk 20 percen
keresztül.

13 KEREKES, E.B., *Illóolajok hatása élelmiszeriparban előforduló mikroorganizmusok
biofilmképzésére és sejt-sejt közötti kommunikációjára.*, Mikrobiológiai Tanszék. 2017, SZTE
TTIK: Szeged.

Eltávolítottuk a maradék festéket, majd 33%-os ecetsav oldattal oldottuk fel a megfestett biofilmeket.

Ezután következett az utolsó lépés, az abszorbancia mérése. Ezt 595 nanométer hullámhosszon végeztük microtiter plate olvasó segítségével (BMG Labtech SPECTROstar Nano, Budapest, Hungary).

A gátlási ráta egy olyan viszonyszám, amely számszerűsíti és százaléklamban kifejezi a felhasznált anyag gátló tulajdonságát.¹⁴ A kiszámításához szükséges képlet a következő:

$$\text{Gátlási ráta (\%)} = (1 - M/K) \times 100$$

M: a minta abszorbancia értéke

K: a kontroll abszorbancia értéke

Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek

A pásztázó elektronmikroszkópos felvételek előkészítése során első lépésként a biofilmeket zsírtalanított fedőlemezeken alakítottuk ki. A 10^8 CFU/ml sejtszámú szuszpenzióban a lemezeket 4 órán át inkubáltuk (37°C). Négyórás letapadást követően a lemezeket átmostuk fiziológiás sóoldattal, majd az előző kísérletekben hatásosnak bizonyuló illóolajokat MIC/2 koncentrációban alkalmaztuk. Pozitív kontrollként a kezeletlen minták szolgáltak. Itt tápoldattal fedtük be a lemezeket.

A 24 óra elteltével a tápoldatokat eltávolítottuk, a le nem tapadt sejteket fiziológiás sóoldattal lemostuk, majd előkészítettük a mintákat a SEM protokollnak megfelelően. A biofilm rögzítése céljából a mintákat 2,5% glutáraldehidben (Molar Chemicals Kft., Halásztelek), szobahőmérsékleten 2 órán át inkubáltuk, majd 50%, 70%, 80%, 90% és abszolút etanollal 2x15 perces időtartamokban víztelenítettük.

A fedőlemezeket ezután tercier-butyl-alkohol:abszolút etanol 1:2, 1:1, 2:1 arányú keverékébe, majd abszolút tercier-butyl-alkoholba helyeztük 1-1 órára, szobahőmérsékleten. A mintákat végül abszolút tercier-butyl-alkoholban 4°C-on fagyasztottuk, és egy éjszakán át fagyasztva szárítottuk.

A mintákat fixáltuk, majd a szükséges aranyréteg felvitelét követően (Quorum Technologies SC 7620 'Mini') pásztázó elektronmikroszkóp segítségével (JEOL JSM IT500-HR scanning electron microscope (Jeol Ltd., Tokio, Japan) vizsgáltuk. A vizsgálat a Szentágothai János Kutatóközponttal együttműködésben, a Környezeti Analitikai és Geoanalitikai Kutatócsoport segítségével történt.

14 Y.SUN – S. CHEN – C. ZHANG – Y. LIU – L. MA – X. ZHANG (2018) *Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of lemon essential oil on the acid tolerance and biofilm formation of Streptococcus mutans.*

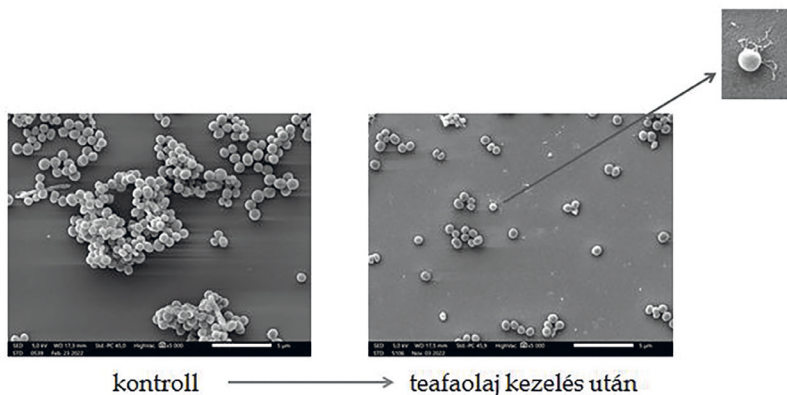
Eredmények

A teafa-illóolaj fő komponense a terpinén-4-ol, amely 38,4%-ban volt jelen a mintában. Ezt követi a *p*-cimén, amely 28,2%-ban volt megtalálható. További, minor komponensek, mint a karveol (7,5%-ban), γ -terpinén (5,6%-ban) és az α -terpineol pedig 4,8%-ban volt detektálható a teafa-illóolajban.

A meghatározott MIC értékek a következőképpen alakultak: az *E. coli* és *K. pneumoniae* baktériumok voltak a legellenállóbbak, 0,43 mg/ml-nak mértük a minimális gátló koncentrációkat. A *S. aureus* baktérium esetében ez az érték 0,31 mg/ml lett. A *S. pneumoniae* volt a legérzékenyebb az illóolajos kezelésre, esetében 0,15 mg/ml-es gátló koncentráció alkalmazására volt szükség.

A gátlási ráta kapcsán a teafa illóolaja hatékonynak bizonyult mind a négy patogénnel szemben, a következő eredmények alapján. A *S. pneumoniae* esetében 82%-os eredményt kaptunk a gátlásra. A *K. pneumoniae* esetében 81% volt a gátlási ráta. Az *E. coli* esetében 75%-os gátlási rátát detektálhattunk. A *S. aureus* biofilm képződésének gátlására pedig 77%-ban volt effektív a teafa.

Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek készítésére a *S. aureus* baktérium esetében volt lehetőségünk. Eredményünk az 1. képen látható.



1. kép: Pásztázó elektronmikroszkópos felvétel *S. aureus* baktérium esetében

A felvételeket megtekintve látható, hogy a kontroll, kezeletlen felvételen a biofilm ép, magas a baktériumszám és összefüggő egységet képeznek a

baktériumok. Az illóolajos kezelés után készült felvételen a biomassza jelentősen lecsökkent, a baktériumszám kevesebb lett és látható, hogy a sejtek izoláltan helyezkednek el, illetve a kinagyított felvételen látható, hogy a sejt lízise is megtörtént.

Összegzés

A nozokomiális fertőzések terjedése világszerte óriási problémát okoz az egészségügyben. Jelenlétük az intézményekben növeli a páciensek kórházi tartózkodását, megnyújtja az ápolási időt, és gyakran halálhoz vezet. Fontos kiemelni, hogy ezen baktériumok gyorsan és hatékonyan fejlesztenek ki különböző rezisztenciamechanizmusokat, amelyek fokozzák ellenálló-képességüket.¹⁵

A fentiek értelmében elengedhetetlen olyan lehetőségek feltérképezése, amelyek hatékony alternatívái lehetnek az alkalmazott fertőtlenítőszer-eknek és antibiotikumoknak.

In vitro kísérleteink célja az volt, hogy bizonyítsuk, a teafa illóolaja hatékonyan lép fel négy, klinikai környezetből izolált patogénnel szemben, így tesztrendszerünkbe az alábbi baktériumokat vontuk be: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, és a *Staphylococcus aureus*.

A vizsgált baktériumok közül az *E.coli* volt a legellenállóbb az illóolajos kezelésre, a *S. pneumoniae* pedig a legérzékenyebb.

Eredményeinket pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat segítségével is igazoltuk.

Következtetésképp levonhatjuk, *in vitro* vizsgálatainkkal sikerült bizonyítani, hogy a teafa illóolaja hatékonyan felveheti a harcot a biofilm-képződés ellen és további kísérletek szükségesek arra vonatkozóan, hogyan lehet ezt a mindennapi, klinikai gyakorlatban alkalmazni. További terveink között szerepel az illóolajok támadáspontjának hatásmechanizmusának feltérképezése, így szeretnénk vizsgálatainkat kiterjeszteni az efflux-pumpa mechanizmusok pontos felderítésére, a hatékonyabb gátlás elérése érdekében.

Irodalom

A.SIKORA, F. ZAHRA (2023) *Nosocomial Infections*

E-B. KERÉKES, É. DEÁK, M. TAKÓ, R. TSERENNADMID, T. PETKOVITS, C. VÁGVÖLGYI, J. KRISCH (2013.) *Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms.*

H. NIKAIDO (2009) *Multidrug Resistance in Bacteria.*

<https://www.nccih.nih.gov/health/tea-tree-oil>

<https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/essential-oils>

https://www.nnk.gov.hu/dokumentumok/NNSR_jelentes_2021._1._resz_Kotelező_surveillance_modulok.pdf (Letöltés: 2024.02.21)

KERÉKES, E.B., *Illóolajok hatása élelmiszeriparban előforduló mikroorganizmusok biofilmképzésére és sejt-sejt közötti kommunikációjára*, Mikrobiológiai Tanszék. 2017, SZTE TTK: Szeged.

M. WRÓBLEWSKA, E. SZYMAŃSKA, K. WINNICKA (2022) *The Influence of Tea Tree Oil on Antifungal Activity and Pharmaceutical Characteristics of Pluronic® F-127 Gel Formulations with Ketoconazole*

P. AGABA, J.TUMUKUNDE, J. V. B. TINDIMWEBWA, AND A. KWIZERA (2017) *Nosocomial bacterial infections and their antimicrobial susceptibility patterns among patients in Ugandan intensive care units: a cross sectional study*

PÁL E. *Az orvosi mikrobiológia tankönyve*, Budapest : Medicina könyvkiadó, 2013., 284–286.

PÁL E. *Az orvosi mikrobiológia tankönyve*, Budapest : Medicina könyvkiadó, 2013., 327.

PÁL E. *Az orvosi mikrobiológia tankönyve*, Budapest : Medicina könyvkiadó, 2013., 264–266.

PÁL E. *Az orvosi mikrobiológia tankönyve*, Budapest : Medicina könyvkiadó, 2013., 266–268.

RODNEY M. DONLAN (2002) *Biofilms: Microbial Life on Surfaces*

Y.SUN, S. CHEN , C. ZHANG, Y. LIU, L. MA, X. ZHANG (2018) *Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of lemon essential oil on the acid tolerance and biofilm formation of Streptococcus mutans.*

Effect of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil against nosocomial biofilm-forming bacteria

EDIT ORMAI¹⁺, BÉLA KOCSIS², ANDREA BÖSZÖRMÉNYI³,
GYÖRGY HORVÁTH^{1*}, VIKTÓRIA LILLA BALÁZS^{1*}

¹ University of Pécs, Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmacognosy

² University of Pécs, Clinical Center, Institute of Medical Microbiology and Immunology

³ Semmelweis University, Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmacognosy

⁺ Presenter

^{*} Supervisors

Bacteria causing nosocomial infections are characterized by rapidly developing antibiotic resistance and the ability to form biofilms. These properties increase their resistance. Another characteristic is their ability to settle on inert surfaces which enhances the possibility of infections in immunosuppressed patients. Therefore it is important to explore alternative solutions to fight against these resistant pathogen in clinical practice.

In our *in vitro* experiments we examined one essential oil and four bacteria. Based on literature data and preliminary results from our research group the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) is proved to be the most effective against these bacteria. We performed our research using tea tree oil. Based on clinical experiences four bacteria were selected which were most commonly isolated from biological samples (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus*). Our aim was to find out which bacteria are the most sensitive and which are the most resistant to the treatment.

To determine the exact composition of tea tree oil analytical test (GC-MS) was performed. The next were the microbiological experiments. We determined the minimal inhibitory concentration (MIC) of tea tree oil using the microdilution method. Biofilms formed by bacteria were grown on 96-well microtiter plates, treated with half of the previously determined MIC concentration, and incubated. The biofilms were fixed, stained, and absorbance was measured at 590 nm to specify the inhibitory effect of the essential oils on biofilm formation.

According to literature data the main component of tea tree oil is terpinen-4-ol. Our findings confirmed that the essential oil we used also contains it in the highest proportion (38%). All four biofilms created by the bacteria we examined were disrupted by the oil treatment. *S. aureus* was the most resistant to the treatment while *S. pneumoniae* was the most sensitive. Our results were also visualized using scanning electronmicroscopy for MRSA bacteria.

Based on our *in vitro* results it can be concluded that tea tree essential oil was effective against biofilms formed by all four bacteria. Our further goal is to formulate a surface disinfectant solution to prevent the spreading of these agents with patients, thereby preventing the development and spread of infection.

„SUPPORTED BY THE ÚNKP-23-4-II NEW NATIONAL EXCELLENCE PROGRAM OF THE MINISTRY FOR CULTURE AND INNOVATION FROM THE SOURCE OF THE NATIONAL RESEARCH, DEVELOPMENT AND INNOVATION FUND.”